饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠、直肠菌群结构及主要菌群数量的影响[1]

杨桂芹　王　琪　刘海英　董维国　朱　鑫

（沈阳农业大学畜牧兽医学院，沈阳 110866）

摘　要：本试验旨在研究饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠和直肠菌群结构和主要菌群数量的影响。采用单因素完全随机化设计，选用 300 只 1 日龄爱拔益加肉仔鸡，随机分成 5 组，每组 6 个重复，每个重复 10 只。5 组肉仔鸡分别饲喂在基础饲粮中添加 0（对照组）、0.5、1.5、2.5 和 5.0 g/kg 菊糖的试验饲粮。试验期为 6 周。采用 PCR-变性梯度凝胶电泳（DGGE）和定量 PCR(qPCR)技术对 42 日龄肉仔鸡盲肠和直肠菌群结构及主要菌群数量进行测定。结果表明：1）饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠和直肠菌群丰富度、盲肠菌群香农指数以及直肠菌群均匀度均无显著影响（P>0.05），但显著降低了盲肠菌群均匀度和直肠菌群香农指数（P<0.05）。PCR-DGGE 图谱上部分优势条带序列分析表明，饲粮添加菊糖促进了肉仔鸡盲肠和直肠厚壁菌门（Firmicutes）中产粪甾醇真细菌（*Eubacterium coprostanoligenes*）、肠单胞球菌（*Intestinimonas* sp.）和盲肠肠球菌（*Enterococcus cecorum*）等细菌的增殖。2）饲粮菊糖添加显著影响了肉仔鸡盲肠、直肠总细菌和大肠杆菌数量（P<0.05）。二次曲线分析显示，当菊糖添加水平分别为 2.71 和 2.66 g/kg 时，盲肠总细菌和大肠杆菌数量最少；与对照组相比，饲粮添加 1.5、2.5、5.0 g/kg 菊糖显著降低了盲肠乳酸菌数量（P<0.05），饲粮添加 0.5 g/kg 菊糖显著增加了直肠乳酸菌数量（P<0.05）；饲粮添加 5.0 g/kg 菊糖时肉仔鸡盲肠、直肠双歧杆菌数量及直肠产气荚膜梭菌数量均为最高，且与对照组差异显著（P<0.05）。综上，在本试验条件下，有利于改善肉仔鸡肠道菌群结构和促进有益菌增殖的菊糖添加水平为 2.5～5.0 g/kg。

关键词：菊糖；菌群结构；菌群数量；肠道；肉仔鸡

中图分类号：S816　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

肠道微生物及其代谢对肉仔鸡的营养、健康与疾病具有重要的影响和调控作用，通过营养方式干预宿主肠道微生物健康已经成为动物营养学研究的热点[1]。菊糖对肉仔鸡肠道的有益功能已经得到广泛证实，其应用也日益受到重视[2-3]。菊糖，也称菊粉，是通过 *D*-果糖分子经 β（1→2）糖苷键连接而成（果聚糖），主要来源于菊芋和菊苣块根中。菊糖无味、无固定形态，易溶于水，熔点高达

收稿日期：2017-06-05

基金项目：国家自然科学基金项目(31372328)

作者简介：杨桂芹（1966—），女，辽宁凌源人，教授，博士，从事家禽营养与饲料科学研究。E-mail: guiqiny@126.com

178 ℃，相对体积质量 1.35，有较强的热稳定性。孙瑞锋等[4]研究表明，饲粮添加 3 g/kg 的菊糖可使肉仔鸡盲肠大肠杆菌和沙门氏菌数量分别降低 14.50%和 36.42%，有效减少了肉仔鸡排泄物氨气散发量。研究发现，来源于菊苣根中的菊糖显著促进了肉仔鸡回肠和盲肠双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌的繁殖[5]；随着菊糖添加量的增加，公猪大肠和粪中粪臭素浓度随之减少，而产气荚膜梭菌在结肠和直肠的数量降低，并推测粪臭素浓度的减少可能与产气荚膜梭菌数量的减少、中短链脂肪酸含量的增加有关[6]。然而，另外的研究表明，饲粮添加菊糖对肉仔鸡肠道菌群无显著影响[7]。本课题组前期研究结果表明，饲粮添加菊糖不影响肉仔鸡的生产性能，但添加 5.0 g/kg 的菊糖显著降低了肉仔鸡排泄物、盲肠和直肠吲哚和粪臭素浓度[8]，为进一步研究其对肉仔鸡肠道菌群的影响，特进行饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠、直肠菌群结构及主要菌群数量影响的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料及饲粮

试验用菊糖为上海某公司生产，纯度>92%，相对分子质量近似 5 000，为白色结晶粉末，无味。基础饲粮为玉米-豆粕型粉状料，其组成及营养水平同文献[8]。

1.2 试验设计及饲养管理

试验采用单因素完全随机化设计，选取 300 只 1 日龄爱拔益加肉仔鸡，随机分为 5 组，每组 6 个重复，每个重复 10 只。Ⅰ组为对照组，饲喂基础饲粮，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组分别饲喂在基础饲粮中添加 0.5、1.5、2.5、5.0 g/kg 菊糖的试验饲粮。试验鸡采用 3 层全阶梯笼养，热风炉供暖，人工喂料，乳头饮水器供水，机械清粪，自由采食和饮水，试验期为 6 周。按常规方法进行疫苗接种和饲养管理。

1.3 样品采集

肉仔鸡饲养至 42 日龄时，每个重复取 1 只鸡（确保每组 3 雄 3 雌），颈静脉放血处死，迅速解剖，分离盲肠和直肠，液氮速冻后，保存在-80 ℃条件下，备测。

1.4 测定指标和方法

1.4.1 菌群结构

1）DNA 提取。盲肠和直肠样本在 4 ℃冰箱解冻后，每 2 只鸡（1 雌 1 雄）的盲肠、直肠分别混合后，采用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）手提法分别提取 15 个盲肠、15 个直肠样本基因组 DNA。

2）细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增：以样品基因组 DNA 为模板，采用细菌通用引物 GC-338F

（5′-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGGCGCGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）和 518R（5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′）扩增样品 16S rDNA 的 V3 区序列。PCR 扩增体系（50 μL）为：10×PCR buffer 5 μL、dNTP（2.5 mmol）3.2 μL、rTaq（5 U/μL）0.4 μL、GC-338F（20 μmol）1 μL、518R（20 μmol）1 μL、模板 DNA 50 ng，补双蒸水（ddH$_2$O）至 50 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。

3）PCR 产物的变性梯度凝胶电泳（DGGE）分析。取 10 μL PCR 的产物进行 DGGE 分析。采用变性梯度为 35%～55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中 56 V、60 ℃条件下电泳 16 h。DGGE 完毕后，采用银染法染色。PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction 试剂盒纯化回收。采用 Quantity one 分析软件包对 DGGE 图谱的电泳条带数目、条带密度进行数字化分析。依据戴斯系数（Cs）构建聚类图，主成分分析（PCA）采用 CANOCO 4.5 软件进行。

计算公式如下：

$$Cs = \frac{2j}{Nx + Ny};$$

$$H = -\sum_{i=1}^{s} pi \ln pi = -\sum_{i=1}^{S} (Ni/N)\ln(Ni/N);$$

$$E = \frac{H}{H\max} = \frac{H}{\ln S}$$

式中：*Cs*、*H*、*S* 和 *E* 分别代表戴斯系数、香农指数、丰富度和均匀度；*Nx* 为 *x* 泳道条带数；*Ny* 为 *y* 泳道条带数；*j* 为 2 个泳道共有的条带数；*pi* 为样品中单一条带的强度在该样品所有条带总强度中所占的比率；*N* 为单一泳道上所有条带的密度；*Ni* 为第 *i* 条带的密度；*H*max 是 *H* 的最大值。

4）DGGE 图谱中优势条带的回收与测序。用灭菌手术刀完整切下 DGGE 图谱中条带清晰、分离明显的优势条带。以 2 μL 回收产物为模板，338F/518R 为引物进行 PCR 扩增。将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后，连接到 PMD18-T 载体上，并转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆进行序列测定，测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，得到条带所代表的细菌类型。

1.4.2　主要菌群数量

总细菌、大肠杆菌、乳酸菌和双歧杆菌引物序列同文献[9]。产气荚膜梭菌引物序列为：上游引物 5′-GGGTTTCAACACCTCCGTG-3′，下游引物 5′-CGATTAAGAGTAATGCAAGG-3′。取 0.5 μL 基因组 DNA 进行定量 PCR(qPCR)反应。采用 20 μL 体系（10 μL 2×SG PCR MasterMix，上游引物、下

游引物（10 μmoL/L）各 0.5 μL，0.5 μL 基因组 DNA，8.5 μL ddH_2O），在 StepOnePlus™实时荧光定量 PCR 仪（美国）上扩增。

反应程序为预变性 95 ℃ 10 min，40 个循环的 95 ℃ 20 s，60 ℃ 30 s。用 1%的琼脂糖凝胶电泳确定有特异扩增后，再扩增 2 个 50 μL 体系的 PCR，进行 PCR 产物回收。扩增产物连接 T 载体。测序正确的质粒测定浓度，根据分子质量计算拷贝数，并进行梯度稀释，作为标准品，制备标准曲线。将 1.4.1 中提取的样本 DNA 稀释 10 倍后上荧光定量 PCR 仪上检测，操作过程同标准曲线构建。根据样品 Ct 值和标准曲线计算出各样品菌群数量，再换算成每克样品中细菌拷贝数的 lg 值。

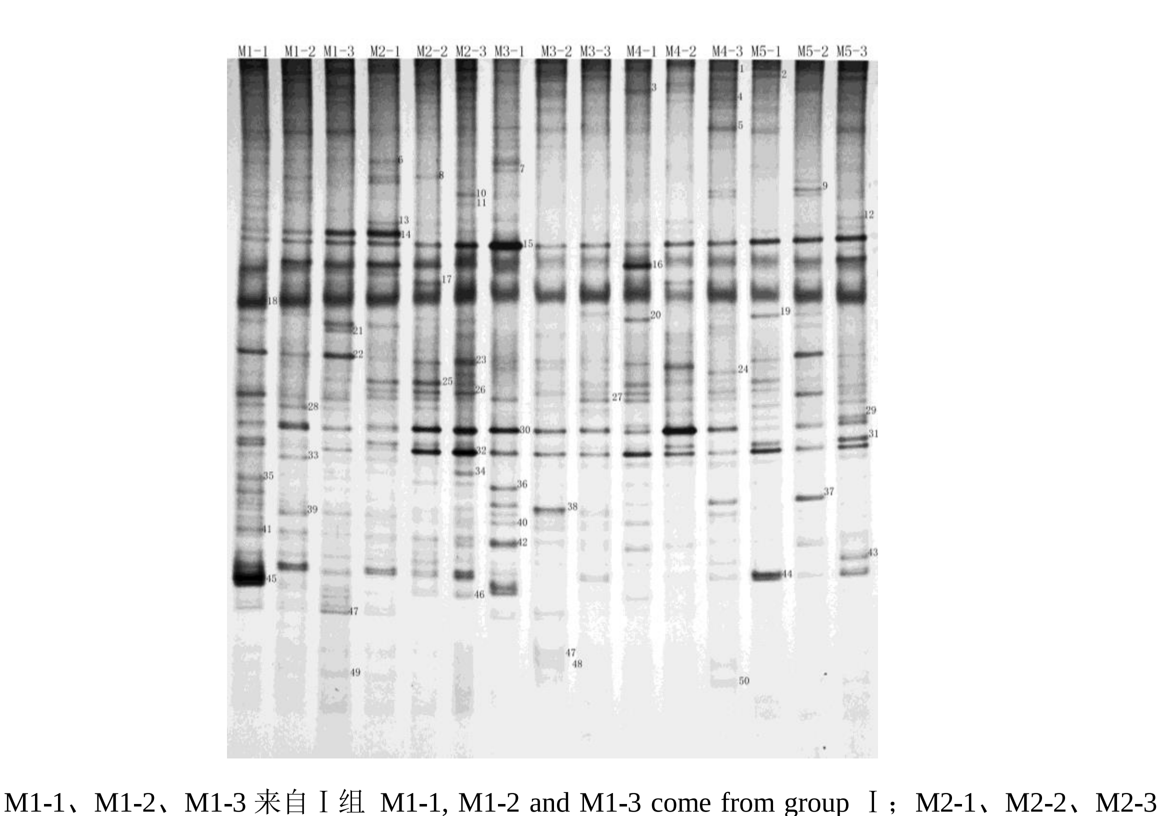
1.5 数据统计分析

以重复为单位进行数据处理和统计，采用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析（one-way ANOVA）过程进行方差分析，采用 Duncan 氏法进行多重比较，并利用 Contrast 中的线性和二次项进行趋势分析。$P<0.05$ 为差异显著。试验数据用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 肉仔鸡盲肠菌群结构

由图 1 可知，15 个盲肠样品共有 50 条条带。M1-1～M5-3 样本中含有的条带数目分别为 20、18、20、18、19、21、19、16、11、19、15、21、18、18、18 条。由表 1 可知，饲粮菊糖添加水平对盲肠菌群香农指数和丰富度无显著影响（$P>0.05$），III、IV组盲肠菌群均匀度显著低于对照组和 II 组（$P<0.05$）。饲粮菊糖添加水平（x）与肉仔鸡盲肠菌群均匀度（y）呈显著的二次曲线关系（$P<0.05$），回归方程为 $y=0.243x^2-0.136x+0.974$（$R^2=0.671\ 7$），当饲粮菊糖添加水平为 2.8 g/kg 时，肉仔鸡盲肠菌群均匀度最小，为 0.950。



M1-1、M1-2、M1-3 来自Ⅰ组 M1-1, M1-2 and M1-3 come from group Ⅰ；M2-1、M2-2、M2-3 来自第Ⅱ组 M2-1, M2-2 and M2-3 come from group Ⅱ；M3-1、M3-2、M3-3 来自Ⅲ组 M3-1, M3-2 and M3-3 come from group Ⅲ；M4-1, M4-2 and M4-3 来自Ⅳ组 M4-1, M4-2 and M4-3 come from group Ⅳ；M5-1、M5-2、M5-3 来自Ⅴ组 M5-1, M5-2 and M5-3 come from group Ⅴ。图 2、图 3 同 The same as Fig.2 and Fig.3。

图 1　肉仔鸡盲肠菌群 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.1　PCR-DGGE fingerprints of microbiota in cecum of broilers

表 1　饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠菌群结构的影响

Table1　Effects of inulin supplemental level on microbial community structure in cecum of broilers

组别 Groups	香农指数 Shannon-Wiener index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
Ⅰ	2.88±0.06	0.98±0.01^{b}	19.33±1.15
Ⅱ	2.87±0.09	0.98±0.00^{b}	19.33±1.53
Ⅲ	2.59±0.28	0.96±0.01^{a}	15.33±4.04
Ⅳ	2.76±0.16	0.97±0.01^{a}	18.33±3.06

V	2.79±0.02	0.97±0.01[ab]	18.00±0.00
差异性 *P* 值 Difference *P*-value	0.207	0.040	0.310
线性 *P* 值 Linear *P*-value	0.570	0.244	0.584
二次 *P* 值 Quadratic *P*-value	0.099	0.005	0.241

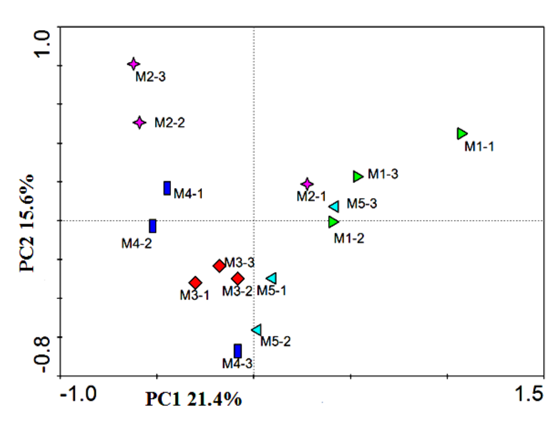
同列数据肩标相同字母或无字母表示差异不显著（P>0.05），不同字母表示差异显著（P<0.05）。下表同。

In the same column, values with the same or without letter superscripts mean no significant difference (P＞0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 肉仔鸡盲肠菌群相似性

PCR-DGGE 图谱的 PCA 见图 2。主成分 1（PC1）和主成分 2（PC2）的贡献率分别为 21.4%、15.6%，二者共解释了 37.0%的 DGGE 图谱信息。PC1 将样本分为左右两部分，III组和IV组样本被分在左半部分，对照组和V组样本被分在右半部分，II组样本存在于两侧。PC2 将样本分为上下两部分，II组样本被分在上半部分，III组样本被分在下半部分，对照组样本除 M1-2 在中间外全部在上边，IV组样本除 M4-1 外全部在下边，V组除 M5-3 外全部在下边。结合 PC1 与 PC2 进行分析，与其他样本离散性最大的是 M1-1，说明该样本与其他样本肠道菌群相似性最低。

图 3 为依据样本的 Cs 构建的聚类图，在 15 个样本中，来自对照组的样本 M1-1 与其他样本相似性最低，相似性系数为 0.44。相似性高的有 4 簇，分别为 M1-2 与 M1-3、M2-2 与 M2-3、M5-1 与 M5-3、M3-3 与 M4-1，相似性系数分别为 0.73、0.76、0.66、0.65。样本 M1-2、M1-3 为同一簇（来自对照组），M5-1、M5-3 为同一簇（来自V组），这两簇的相似性较低（相似性系数为 0.59），说明菊糖对肉仔鸡盲肠菌群结构产生了一定的影响。这与 PCA 结果相似。



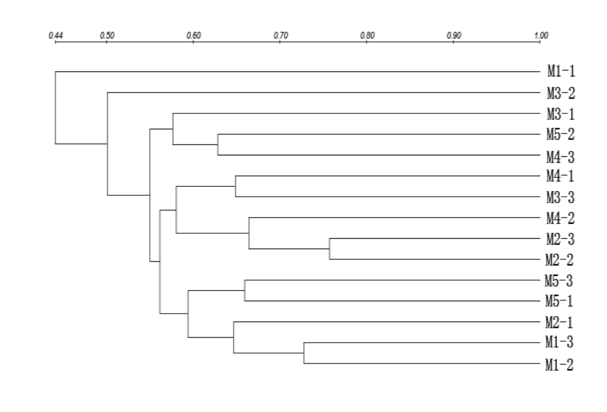


图 2　盲肠菌群 DGGE 图谱条带的 PCA

Fig.2　PCA of bands in DGGE fingerprints of cecal microbiota

图 3　盲肠菌群 UPGMA 相似性分析

Fig.3　Analysis of UPGMA similarity of cecal microbiota

2.3　肉仔鸡盲肠菌群 DGGE 图谱优势条带序列分析

试验对盲肠 DGGE 指纹图谱中具有共性、特异性的 10 条条带进行了回收、克隆和测序。由表 2 可知，所有序列与 GenBank 中 16S rDNA 序列的相似性在 87%～100%。除 15 号条带的相似菌来自拟杆菌门（Bacteroidetes）外，其余均来自厚壁菌门（Firmicutes）。37 号条带为 M4-1、M4-3、M5-2 共有条带，其所代表的序列的最相似菌为真细菌属中的产粪甾醇真细菌（*Eubacterium coprostanoligenes*），相似度为 95%。16、18 号条带为各组共有条带，其所代表的相似菌分别是 *Dielma fastidiosa* 和 *Faecalib acterium prausnitzii*，相似度分别为 87%和 96%。

表 2　肉仔鸡盲肠菌群 DGGE 图谱优势条带的序列分析结果

Table 2　Sequence analysis results of dominant bands in DGGE fingerprints of cecal microbiota in broilers

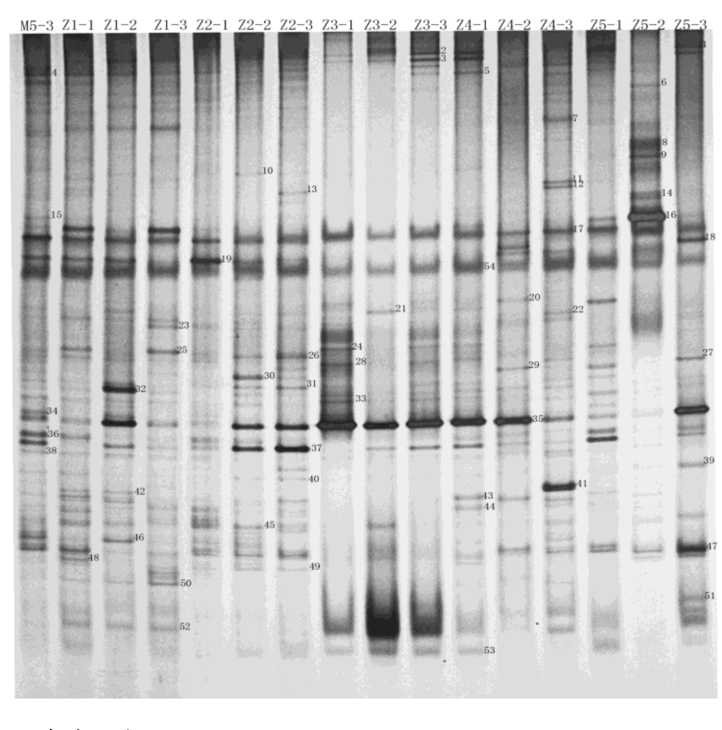
条带号 Band number	登录号 Accession number	相似菌 Similar strains	相似度 Similarity/%	分类 Classification	备注 Note
14	NR_112692	*Lactobacillus aviarius*	100	厚壁菌门	Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ组共有
15	NR_074277	*Bacteroides thetaiotaomicron*	100	拟杆菌门	共有（M5-3 除外）
16	NR_125593	*Dielma fastidiosa*	87	厚壁菌门	共有
18	NR_028961	*Faecalibacterium prausnitzii*	96	厚壁菌门	共有
22	NR_112900	*Christensenella minuta*	91	厚壁菌门	Ⅰ、Ⅴ组共有
26	NR_119274	*Lactobacillus crispatus*	100	厚壁菌门	除 M1-2、M1-3、M3-1、M4-2 外，其他共有
30	NR_024905	*Enterococcus cecorum*	99	厚壁菌门	共有（M1-1、M3-1 除外）
32	NR_028725	*Lactobacillus salivarius*	100	厚壁菌门	共有（M1-1 除外）
37	NR_104907	*Eubacterium coprostanoligenes*	95	厚壁菌门	M4-1、M4-3、M5-2 共有
44	NR_028997	*Subdoligranulum variabile*	99	厚壁菌门	除 M1-1、M3-2、M4-1、M4-2 外，其他共有

Firmicutes：后壁菌门；Bacteroidetes

2.4　肉仔鸡直肠菌群结构

由图 4 可知，Z1-1～Z5-3 样本中含有的条带数目分别是 24、21、19、15、19、19、11、9、14、17、13、27、18、14、15 条。由表 3 可知，饲粮菊糖添加水平对直肠菌群均匀度和丰富度均无显著

影响（*P*>0.05），III组直肠菌群香农指数显著低于除Ⅴ组之外的其余各组（*P*<0.05）。



Z1-1、Z1-2、Z1-3 来自Ⅰ组 Z1-1, Z1-2 and Z1-3 come from group Ⅰ；Z2-1、Z2-2、Z2-3 来自II组 Z2-1, Z2-2 and Z2-3 come from group Ⅱ；Z3-1、Z3-2、Z3-3 来自III组 Z3-1, Z3-2 and Z3-3 come from group Ⅲ；Z4-1、Z4-2、Z4-3 来自Ⅳ组 Z4-1, Z4-2 and Z4-3 come from group Ⅳ；Z5-1、Z5-2、Z5-3 来自Ⅴ组 Z5-1, Z5-2 and Z5-3 come from group Ⅴ。图 5、图 6 同 The same as Fig.5 and Fig.6。

图 4 肉仔鸡直肠菌群 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.4 PCR-DGGE fingerprints of microbiota in rectum of broilers

表 3 饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡直肠菌群多样性的影响

Table 3 Effects of inulin supplemental level on microbial community structure in rectum of broilers

组别 Groups	香农指数 Shannon-Wiener index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
I	3.00±0.13^{b}	0.98±0.01	21.33±2.52
II	2.78±0.12^{b}	0.97±0.01	17.67±2.31
III	2.36±0.23^{a}	0.99±0.00	11.33±2.52
Ⅳ	2.82±0.35^{b}	0.97±0.00	19.00±7.21
Ⅴ	2.64±0.16^{ab}	0.96±0.02	15.67±2.08

差异性 *P* 值 Difference *P*-values	0.045	0.326	0.080
线性 *P* 值 Linear *P*-values	0.217	0.075	0.291
二次 *P* 值 Quadratic *P*-values	0.127	0.795	0.226

2.5 肉仔鸡直肠菌群相似性

肉仔鸡直肠菌群 PCR-DGGE 图谱 PCA 见图 5。PC1 和 PC2 的贡献率分别为 20.6%、14.6%，共解释了 34.60%的 DGGE 图谱信息。PC1 将样本分为左右两部分，对照组、II 组全部在右侧，III、V 组全部在左侧，IV组两侧都存在。PC2 将样本分为上下两部分，对照组全部在上边，II 和 V 组全部在下边，III和IV组上下都存在。Z3-3 和 Z4-1 距离最为紧密。距离最远的是 Z5-2 和 Z1-2（分别来自V组和对照组）。由图 6 可知，15 个样本中，相似性较高的有 3 簇，分别为 Z4-1 与 Z3-3、Z1-1 与 Z1-3、Z3-1 与 Z4-1、Z3-3，相似系数分别为 0.72、0.64、0.60。与其余样本相似系数最低的是 Z5-2，相似系数仅为 0.27。上述结果表明V组与其余 4 个组直肠菌群相似性最低。

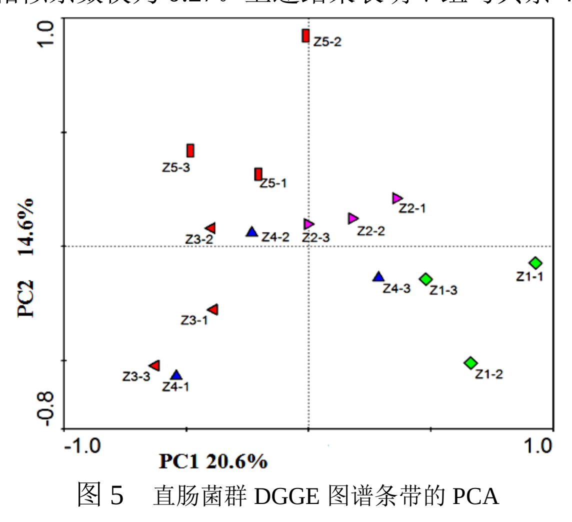


图 5 直肠菌群 DGGE 图谱条带的 PCA

Fig.5 PCA of bands in DGGE fingerprints of rectal microbiota

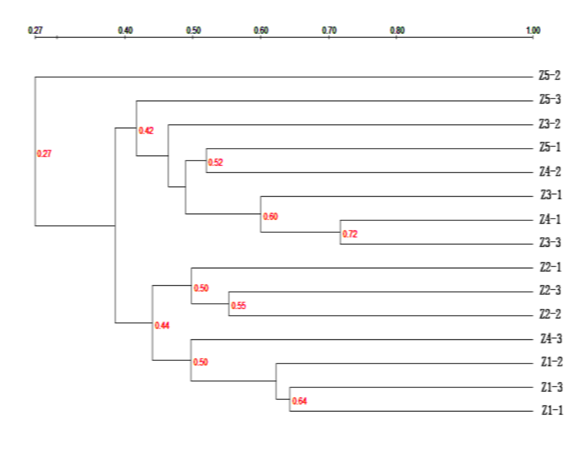


图 6 直肠菌群 UPGMA 相似性分析

Fig.6 Analysis of UPGMA similarity of rectal microbiota

2.6 肉仔鸡直肠菌群 DGGE 图谱优势条带序列分析

本试验回收了 6 条直肠菌群 DGGE 图谱具有共性、特异性的条带，进行克隆和测序。由表 4 可知，各序列和 GenBank 中 16S rDNA 序列的相似性在 95%～100%。2 号条带为 Z3-1、Z3-3、Z4-1

共有的条带，其所代表的最相似菌为肠单胞球菌（*Intestinimonas* sp.），相似度为 95%。33 号条带为 Z2-3、Z3-1、Z4-3、Z5-1 共有条带，其序列所代表的最相似菌为盲肠肠球菌（*Enterococcus cecorum*），相似度为 100%。36 号条带为 Z2-2、Z2-3、Z4-3 共有条带，其所代表的最相似菌为普拉梭菌（*Faecalibacterium prausnitzii*），相似度为 96%。45 号条带为 Z2-3、Z5-3 共有条带，其序列所代表的最相似菌为苏德式芽孢梭菌（*Clostridium sordelli*），相似度为 100%。

表 4　直肠菌群 DGGE 图谱优势条带的序列分析结果

Table 4　Sequence analysis results of dominant bands in DGGE fingerprints of rectal microbiota

条带号 Band number	登录号 Accession number	相似菌 Similar strain	相似度 Similarity/%	分类 Classification	备注 Note
2	KP114242	肠单胞球菌	95	厚壁菌门 Intestinimonas	Z3-1、Z3-3、Z4-1 共有
7	EU873585	不可培养菌	98	细菌；环境样本	Z5-2 特有
33	NR_114779	盲肠肠球菌	100	厚壁菌门肠球菌属	Z2-3、Z3-1、Z4-3、Z5-1 共有
36	NR_028961	普拉梭菌	96	厚壁菌门 Faecalibacterium	Z2-2、Z2-3、Z4-3 共有
43	NR_028725	唾液乳杆菌	100	厚壁菌门乳杆菌属	除 Z1-1、Z3-1、Z5-2 外，其他样品共有
45	KR364762	苏德式芽孢梭菌	100	厚壁菌门梭菌属	Z2-3、Z5-3 共有

2.7　肉仔鸡盲肠菌群数量

由表 5 可知，各试验组盲肠总细菌、大肠杆菌数量均显著低于对照组（*P*<0.05）。III、IV、V 组盲肠乳酸菌数量显著低于对照组和 II 组（*P*<0.05）；II、V 组盲肠双歧杆菌数量显著高于对照组及III、IV组（*P*<0.05），以 V 组盲肠双歧杆菌数量最多。饲粮菊糖添加水平对盲肠产气荚膜梭菌数量无显著影响（*P*>0.05）。除双歧杆菌外，盲肠各细菌数量与饲粮菊糖添加水平均呈显著的线性关系（*P*<0.05）；同时，盲肠总细菌和大肠杆菌数量与饲粮菊糖添加水平呈显著的二次曲线关系（*P*<0.05），当饲粮菊糖添加水平分别为 2.71 和 2.66 g/kg 时，盲肠总细菌和大肠杆菌数量最少。

表 5　饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠主要菌群数量的影响

Table5　Effects of inulin supplemental level on main microbial populations in cecum of broilers　lg(拷贝数/g)

组别 Groups	总细菌 Total	大肠杆菌	乳酸菌 *Lac-*	双歧杆菌	产气荚膜梭菌

	bacteria	*Escherichia coli*	*tobacilli*	*Bifidobacteria*	*Clostridium perfringens*
Ⅰ	10.24±0.83[b]	8.99±1.06[b]	7.32±1.23[b]	5.64±0.96[a]	5.22±0.40
Ⅱ	8.77±0.07[a]	7.72±0.40[a]	7.35±0.98[b]	6.73±0.07[b]	5.08±0.17
Ⅲ	7.72±1.47[a]	7.34±1.33[a]	5.63±0.59[a]	5.54±0.56[a]	5.08±0.14
Ⅳ	8.93±0.98[a]	7.18±0.75[a]	6.75±1.00[a]	5.49±1.08[a]	5.07±0.09
Ⅴ	8.52±0.31[a]	7.59±0.64[a]	6.80±0.12[a]	6.76±0.56[b]	4.91±0.10
差异性 *P* 值 Difference *P*-value	0.001	<0.001	0.001	0.010	0.106
线性 *P* 值 Linear *P*-value	0.001	<0.001	0.001	0.230	0.014
二次 *P* 值 Quadratic *P*-value	0.002	<0.001	0.065	0.276	0.902

2.8 肉仔鸡直肠菌群数量

由表 6 可知，Ⅲ、Ⅴ组直肠总细菌和大肠杆菌数量显著低于对照组及Ⅱ、Ⅳ组（$P<0.05$）。Ⅱ组直肠乳酸菌数量显著高于其他各组（$P<0.05$）。Ⅴ组直肠双歧杆菌数量最多，显著高于对照组及Ⅲ、Ⅳ组（$P<0.05$）。Ⅴ组直肠产气荚膜梭菌数量显著高于其余各组（$P<0.05$）。除大肠杆菌外，直肠各细菌数量与菊糖添加水平均呈显著的线性关系（$P<0.05$）；同时，直肠双歧杆菌、产气荚膜梭菌数量与饲粮菊糖添加水平呈显著的二次曲线关系（$P<0.05$），当饲粮菊糖添加水平为 2.96 g/kg 时，直肠双歧杆菌数量最少。

表 6　饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡直肠主要菌群数量的影响

Table 6　Effects of inulin supplemental level on main microbial populations in rectum of broilers　lg(拷贝数/g)

组别 Groups	总细菌 Total bacteria	大肠杆菌 *Escherichia coli*	乳酸菌 *Lactobacilli*	双歧杆菌 *Bifidobacteria*	产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*
Ⅰ	10.12±0.20[b]	8.56±0.63[bc]	8.79±0.32[b]	6.97±0.77[a]	4.75±0.14[a]
Ⅱ	10.22±0.99[b]	8.17±1.15[ab]	9.33±1.89[c]	7.60±0.96[b]	4.95±0.17[a]

III	8.56 ± 0.30^{a}	7.87 ± 0.24^{a}	7.46 ± 0.71^{a}	5.66 ± 0.07^{a}	5.03 ± 0.09^{a}
Ⅳ	10.19 ± 0.52^{b}	8.81 ± 0.70^{c}	8.32 ± 0.81^{ab}	6.07 ± 0.56^{a}	4.35 ± 0.72^{a}
Ⅴ	9.51 ± 0.15^{a}	7.25 ± 0.13^{a}	8.81 ± 1.73^{b}	7.66 ± 0.31^{b}	5.44 ± 0.44^{b}
差异性 *P* 值 Difference *P*-value	0.001	0.002	<0.001	<0.001	0.010
线性 *P* 值 Linear *P*-value	0.017	0.328	0.006	0.010	0.012
二次 *P* 值 Quadratic *P*-value	0.949	0.840	0.815	0.002	0.038

3 讨 论

3.1 饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠和直肠菌群结构的影响

通过 PCR-DGGE 图谱中条带的位置、数量和亮度等可综合反映肠道菌群的多样性。Rehman 等[7]研究表明，在玉米-豆粕型饲粮中添加 10 g/kg 的菊糖对 42 日龄肉仔鸡空肠和盲肠菌群 DGGE 图谱条带数量及菌群多样性指数无显著影响。Yang 等[10]研究表明，饲粮添加 1.2 g/kg 的菊糖不显著影响肉仔鸡盲肠菌群多样性、丰富度和均匀度。体外试验也证实，添加菊糖对肉仔鸡盲肠、直肠食糜发酵液中菌群多样性和丰富度的影响均不显著，但发酵液中 DGGE 图谱条带数量有所降低[11]。本试验结果表明，饲粮添加菊糖对肉仔鸡盲肠、直肠菌群 DGGE 图谱条带数量均无显著影响，但各菊糖添加组条带数不同程度低于对照组，且多样性指数均有所降低；但添加一定量的菊糖后显著降低了肉仔鸡盲肠菌群均匀度和直肠菌群香农指数，该结论与以上报道略有差异。这与 PCR-DGGE 技术的局限性（如 DNA 的提取效率、DNA 的提取和纯化方法以及 PCR 扩增过程的误差等）有关。另外，采用 DGGE 技术只能对优势菌群进行检测与分析。本试验聚类分析和 PCA 表明，盲肠菌群对照组的 M1-2、M1-3 与 5.0 g/kg 菊糖添加组的 M5-1、M5-3 样本的相似性仅为 0.59；而直肠菌群中，与其余样本相似性系数最低的是 Z5-2，仅为 0.27。上述结果说明饲粮添加菊糖影响了肉仔鸡盲肠和直肠菌群的组成。本试验对 DGGE 图谱优势菌群序列分析表明，饲粮添加菊糖后，DGGE 图谱出现了不同的优势条带。盲肠样本的 37 号条带仅存在于菊糖添加组，其序列所代表的是厚壁菌门的 *Eubacterium coprostanoligenes*，说明添加菊糖能促进该菌生长。直肠样本 2、33、36、45 号条带也只存在于菊糖添加组，其序列所代表的是厚壁菌门的球菌或梭菌类细菌，说明添加菊糖促进了直肠中以上细菌的

生长，此结果与 Yang 等[10]报道的饲粮添加 1.2 g/kg 的菊糖有助于不可培养的厚壁菌门毛螺菌科(uncultured Lachnospiraceae)及不可培养的拟杆菌门(uncultured Bacteroidetes)细菌增殖的结果基本一致。

3.2 饲粮菊糖添加水平对肉仔鸡盲肠和直肠主要菌群数量的影响

家禽肠道微生物一般分为两大类，即有害菌（病源菌）和有益菌（病源菌抑制菌）。有害菌主要包括大肠杆菌、沙门氏菌和产气荚膜梭菌等，而乳酸菌和双歧杆菌被认为是肠道有益菌[12-13]。有益菌的增加会降低有害菌在肠道中的发酵[14]。有关饲粮添加菊糖对肉仔鸡肠道菌群数量影响的结果不完全一致。林晨[15]发现，菊糖能够调节肉仔鸡肠道内微生物菌群，且菊粉添加水平越高，大肠杆菌数量越少，双歧杆菌和乳酸菌数量越多。Nabizadeh[16]研究表明，饲粮添加 10 g/kg 的菊糖显著降低了肉仔鸡盲肠大肠杆菌数量。Zhao 等[17]研究表明，饲粮添加 2.5 和 5.0 g/kg 的果聚糖显著提高了 31 日龄肉公鸡盲肠乳酸菌和双歧杆菌数量，降低了盲肠大肠杆菌和产气荚膜梭菌的数量，并降低了排泄物氨的散发量。Kareem 等[18]研究表明，乳酸菌代谢物——益生素（postbiotics）分别与 0.8%、1.0%的菊糖混合添加显著提高了 42 日龄肉仔鸡排泄物乳酸菌的数量，降低了肠杆菌（*Enterobacteriaceae*）数量。但另外的研究则表明菊糖对肠道菌群数量无显著影响，如 Biggs 等[19]报道，在玉米-豆粕型饲粮中添加 4 g/kg 的菊糖对 21 日龄肉仔鸡盲肠乳酸菌、双歧杆菌、产气荚膜梭菌和大肠杆菌数量均无显著影响。Abdel-Raheem 等[20]也证明，益生素和合生素对肉仔鸡盲肠乳酸菌和大肠杆菌数量无显著影响。不过，Abdelqader 等[21]研究表明，菊糖虽然没有显著增加产蛋鸡回肠、盲肠中乳酸菌、双歧杆菌数量，但显著减少了回肠、盲肠大肠杆菌数量。本试验结果表明，饲粮添加 1.5、2.5、5.0 g/kg 菊糖显著降低了盲肠乳酸菌数量，但添加 0.5 g/kg 菊糖显著增加了直肠乳酸菌数量；饲粮添加 1.5、5.0 g/kg 菊糖显著降低了盲肠、直肠总细菌和大肠杆菌数量，但添加 5.0 g/kg 菊糖显著增加了盲肠、直肠双歧杆菌数量；饲粮添加菊糖对肉仔鸡盲肠产气荚膜梭菌数量无显著影响，但添加 5.0 g/kg 菊糖显著增加了直肠产气荚膜梭菌数量。本试验所得结果与上述报道不完全一致，这与试验所用鸡的日龄、性别、取样部位、菊糖来源、结构与剂量等不同有关。另外，菊糖的益生效果也与肉仔鸡的饲养环境和个体因素有很大的关系[5]。本试验中，5.0 g/kg 菊糖添加组在促进有益菌增殖的同时，也同样促进了直肠有害菌（产气荚膜梭菌）的增殖，说明饲粮中添加高水平的菊糖不利于控制有害菌的增殖。菊糖的益生作用主要是源于其特殊的结构不能被家禽的胃和胰分泌的消化酶所消化，而是进入后肠被有益菌如乳酸菌、双歧杆菌所利用，产生短链脂肪酸和乳酸[22-23]，进而降低了有毒代谢

物（氨、吲哚、酚类等）的产生[24]。

综上，饲粮添加菊糖降低肉仔鸡排泄物、盲肠和直肠吲哚和粪臭素浓度[8]主要是通过调整菌群结构，降低肠道总细菌、大肠杆菌数量，增加乳酸菌和双歧杆菌的数量来实现的。

4 结　论

① 饲粮添加适宜水平的菊糖显著降低了肉仔鸡盲肠菌群均匀度和直肠菌群香农指数，促进了肉仔鸡盲肠和直肠厚壁菌门 *Eubacterium coprostanoligenes*、*Intestinimonas* sp.和 *Enterococcus cecorum* 等细菌增殖。

② 饲粮添加适宜水平的菊糖显著降低了肉仔鸡盲肠、直肠总细菌和直肠大肠杆菌数量，增加了直肠乳酸菌、盲肠和直肠双歧杆菌及直肠产气荚膜梭菌数量。

③ 在本试验条件下，肉仔鸡饲粮菊糖适宜添加水平为 2.5～5.0 g/kg。

参考文献：

[1] 马曦,韩萌,李德发.猪肠道微生物代谢与思考[C]//中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十二次动物营养学术研讨会论文集.北京:中国农业大学出版社,2016:3–14.

[2] DANKOWIAKOWSKA A,KOZŁOWSKA I,BEDNARCZYK M.Probiotics,prebiotics and snybiotics in poultry-mode of action,limitation,and achievements[J].Journal of Central European Agriculture,2013,14(1):467–478.

[3] BUCŁAW M.The use of inulin in poultry feeding:a review[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2016,100(6):1015–1022.

[4] 孙瑞锋,步长英,李同树.菊糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡肠道菌群数量及排泄物氨气散发量的影响[J].华北农学报,2008,23(S1):252–256.

[5] REBOLÉ A,ORTIZ L T,RODRÍGUEZ M L,et al.Effects of inulin and enzyme complex,individually or in combination,on growth performance,intestinal microflora,cecal fermentation characteristics,and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat and barley-based diet[J].Poultry Science,2010,89(2):276–286.

[6] VHILE S G,KJOS N P,SØRUM H,et al.Feeding jerusalem artichoke reduced skatole level and changed intestinal microbiota in the gut of entire male pigs[J].Animal,2012,6(5):807–814.

[7] REHMAN H,HELLWEG P,TARAS D,et al.Effects of dietary inulin on the intestinal short chain fatty acids and microbial ecology in broiler chickens as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis[J].Poultry Science,2008,87(4):783–789.

[8] 王琪,管倩俩,杨桂芹,等.饲粮添加菊糖对肉仔鸡生长性能、排泄物及肠道主要臭气化合物浓度的影响[J].动物营养学报,2016,28(12):3875–3884.

[9] 张沛.肉仔鸡粪臭素产生的基本规律及与肠道微生物组成的变化关系研究[D].硕士学位论文.沈阳:沈阳农业大学,2016.

[10] YANG G Q,YIN Y,LIU H Y,et al.Effects of dietary oligosaccharide supplementation on growth performance,concentrations of the major odor-causing compounds in excreta,and the cecal microflora of broilers[J].Poultry Science,2016,95(10):2342–2351.

[11] 侯瑞.菊糖和大豆寡糖对体外条件下肉仔鸡粪臭素产量及肠道菌群的影响[D].硕士学位论文.沈阳:沈阳农业大学,2015.

[12] LOPES M,ROLL V F B,LEITE F L,et al.Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts[J].Poultry Science,2013,92(3):638–644.

[13] DE PAIVA J B,LEITE J L,Da SILVA L P M,et al.Influence of the major nitrite transporter NirC on the virulence of a Swollen Head Syndrome Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) strain[J].Veterinary Microbiology,2015,175(1):123–131.

[14] HAJATI H,REZAEI M.The application of prebiotics in poultry production[J].International Journal of Poultry Science,2010,9(3):298–304.

[15] 林晨.菊粉对断奶仔猪和肉仔鸡后肠微生物作用的研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2004.

[16] NABIZADEH A.The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora,gut morphology,and performance[J].Animal Feed Science and Technology,,2012,21(4):725–734.

[17] ZHAO P Y,WANG J P,KIM I H.Effect of dietary levan fructan supplementation on growth performance,meat quality,relative organ weight,cecal microflora,and excreta noxious gas emission in broilers[J].Journal of Animal Science,2013,91(11):5287–5293.

[18] KAREEM K Y,LOH T C,FOO H L,et al.Effects of dietary postbiotic and inulin on growth perfor-

mance,IGF1 and GHR mRNA expression,faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers[J].BMC Veterinary Research,2016,12:163.

[19] BIGGS P,PARSONS C M,FAHEY G C.The effects of several oligosaccharides on growth performance,nutrient digestibilities,and cecal microbial populations in young chicks[J].Poultry Science,2007,86(11):2327–2336.

[20] ABDEL-RAHEEM S M,ABD-ALLAH S M S,HASSANEIN K M A.The effects of prebiotic,probiotic and synbiotic supplementation on intestinal microbial ecology and histomorphology of broiler chickens[J].International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences,2012,6(4):277–289.

[21] ABDELQADER A,AL-FATAFTAH A R,DAŞ G，et al.Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance,eggshell quality,intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production[J].Animal Feed Science and Technology,2013,179(1/2/3/4):103–111.

[22] SAMANTA A K,SENANI S,KOLTE A P,et al.Effect of prebiotic on digestibility of total mixed ration[J].Indian Veterinary Journal,2012,89(1):41–42.

[23] MIREMADI F,SHAH N P.Applications of inulin and probiotics in health and nutrition[J].International Food Research Journal,2012,19(4):1337–1350.

[24] SAMANTA A K,JAYAPAL N,SENANI S,et al.Prebiotic inulin:useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora[J].Brazilian Journal of Microbiology,2013,44(1):1–14.

Effects of Inulin Supplemental Level on Microbial Community Structure and Main Microbial Populations in Cecum and Rectum of Broilers

YANG Guiqin　WANG Qi　LIU Haiying　DONG Weiguo　ZHU Xin

(*College of Animal Husbandry and Veterinary, Shenyang Agricultural University, Shenyang* 110866, *China*)

Abstract: The purpose of this experiment was to study the effects of inulin supplemental level on microbial community Structure and main microbial populations in cecum and rectum of broilers. Three hundred 1-day-old AA+ broilers were selected and randomly distributed into five groups with six replicates per group and ten broilers per replicate by single-factor completely random design. Broilers in those five

groups were fed a basal diet supplemented with 0, 0.5, 1.5, 2.5 and 5.0 g/kg inulin, respectively. The experiment lasted for 6 weeks. The microbial community structure and the main microbial populations in cecum and rectum of 42-day-old broilers were measured using the PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitative PCR (qPCR) techniques. The results showed as follows: 1) inulin supplemental level had no significant effects on the cecal and rectal microbial richness, the cecal microbial Shannon-Wiener index and the rectal microbial evenness of broilers (P>0.05), but significantly decreased the cecal microbial evenness and rectal microbial Shannon-Wiener index (P<0.05). Based on the analysis of some dominant bands in DGGE fingerprint, diet supplemented with inulin promoted the growth of *Eubacterium coprostanoligenes*, *Intestinimonas* sp. and *Enterococcus cecorum* and so on from Firmicutes in cecum and rectum of broilers. 2) Diet supplemented with inulin significantly affected the populations of total bacteria and *Escherichia coli* in cecum and rectum of broilers (P<0.05). Quadratic curve analysis showed that the populations of total bacteria and *Escherichia coli* were the fewest in cecum of broilers when inulin supplemental levels were 2.71 and 2.66 g/kg, respectively. Compared with control group, diet supplemented with 1.5, 2.5 and 5.0 g/kg inulin significantly decreased the populations of cecal *Lactobacillus* （P<0.05）, while diet supplemented with 0.5 g/kg inulin significantly increased the populations of rectal *Lactobacillus* (P<0.05). The populations of cecal and rectal *Bifidobacteria* and rectal *Clostridium perfringens* were the most when diet supplemented with 5.0 g/kg inulin, and the differences were significant compared with control group (P<0.05). Thus, results from the current study suggest that supplementation of 2.5 to 5.0 g/kg inulin to basal diet may have the beneficial effects on improving the microbial community and promoting the growth of beneficial bacteria in intestine of broilers under this experimental condition.

Key words: inulin; microbial community; microbial population; intestine; broilers

---

Author, YANG Guiqin, professor, E-mail: guiqiny@126.com （责任编辑　菅景颖）